中華農業研究 (Jour. agric. Res. China) 30(2):133~139 (1981)

秈稉稻雜種的花葯培養[1]

蔡新聲 鄧耀宗 賴本智 紀廼淳[2]

摘要：秈稉稻雜種後代的繼續分離及部分不稔，限制了遺傳質的互換和後代的迅速固定，花葯培養獲得雙單元體純系的育種方法提供了克服這些困難的機會。

秈稉稻雜種花葯的培養，癒傷組織誘導率頗高，但由此癒傷組織分化成的植株大部分為白苗，綠苗的百分率極低。秈稉稻雜種花葯癒傷組織分化成單元體及自然倍加的多元體植株比自然倍加的雙單元體植株多，稉稻品種的花葯癒傷組織，分化成雙單元體的植株却相反的比單元體及多元體多。

秈稉稻雜種花葯癒傷組織的分化能力受癒傷組織形成的早晚影響，在花葯培養早期（例如培養 30~40 天後）所形成的癒傷組織具有較佳的分化能力。而培養末期（例如培養 60~70 天後），所形成的癒傷組織將喪失其分化綠苗的能力。

秈稉稻雜種後代的繼續分離及部分不稔限制了遺傳質的互換及後代的迅速固定。中研院吳旭初博士自 1972 年開始即嘗試利用培養雜種 F_1 的花葯，以產生單倍體後經染色體倍加獲得雙單元體純系的方法來克服這些困難。經過多年的試驗研究得知這種方法是可行的 (1,5,11,13,14,15)。本研究為許多秈稉稻雜種花葯培養的結果，並與一般稉稻品種比較兩者間之差異，以為將來實際育種之參考。

試驗材料與方法

花葯培養所用的材料為表 1 及表 3 所列雜交組合及數種稉稻及秈稻品種之花葯。將劍葉葉耳距下位葉葉耳約 5 cm 時之稻穗連同劍葉摘下，以 70 % 的酒精擦拭葉鞘外部後，取出幼穗，浸漬於 70 % 酒精中 30 秒，再以 0.5 % 的次氯酸鈉消毒 3 分鐘，在無菌水沖洗 3—4 次後，將屬於單核期之花葯以陳等氏 (8) 所述之方法接種於含有 NAA 4 mg/l, Kinetin 2 mg/l, sucrose 6 % 及大量無機鹽類減半之 MS 培養基上 (12)，培養溫度為 27±1°C，光照 500 ~ 1,000 lux，光期 16 小時，以進行癒傷組織之誘導。癒傷組織形成約 10 天左右，繼代培養於含有 NAA 1 mg/l, Kinetin 4 mg/l 及 sucrose 3 % 之全量 MS 無機鹽類固體分化培養基上。培養溫度及光期不變，光照增為 1,500 lux，以進行植物體再分化之誘導。

分化後的綠苗，待其在試管內長出較好的根系，移於土中盆栽。花葯植株染色體倍數的檢定，以植株開花之結實率及性狀來判別。一般而言，單元體植株，葉狹細，內外穎細小，且不結種子；二元體植株正常，結實率甚佳；多元體植株、葉寬大、內外穎粗大，有芒，結實率欠佳。

結　　果

水稻花葯在培養三週後即開始自開裂的的花葯中長出白色或淡黃色的癒傷組織。表一顯示不同雜

---

1. 臺灣省農業試驗所 研究報告 第 980 號。
2. 本所農藝系技正、技正、技佐及研究助理。臺灣省 臺中縣 霧峰鄉。

交組合 F_1 之花葯培養，其癒傷組織形成率有極大的差異。一般而言，稉稻與稉稻雜交 F_1 花葯之癒傷組織形成率高於秈稻與稉稻雜交種，如 M 9 × 嘉農育 247 號及 SD 7 ×嘉農育 243 號二雜交組合，癒傷組織形成率分別高達 42.5 % 及 28.0 % ，而秈稉稻雜交種則變異範圍較大，高者可達 34.0 % (M 9 × IR 30)，低者僅 1.4 %〔(BG 35-2×PI 162319)×Milyang 23〕。秈稉稻雜交種中含M 9 及 IR 30 之組合，癒傷組織誘導率都較高，可能 M 9 及 IR 30 是稉稻或秈稻中較易形成花葯癒傷組織的品種。稉稻各品種間的花葯癒傷組織誘導率頗高，其中以臺農 67 號 (45.0 %)最高，臺中 65 號 (37.2 %) 次之，臺南 5 號 (33.1 %) 最低。秈稻則一般較低，如 IR 36 為 0.6 %，嘉秈 11 號為 0 % (表 3) 。

表 1. 秈稉稻雜種花葯癒傷組織的誘導率 (1979 年二期作)

Table 1. Anther callus developed from hybrid (*japonica* x *indica*) rices. (Second Crop, 1979)

Cross combinations	No. of anthers cultured	No. of anthers forming callus	Percent of anthers forming callus
(M 9×Milyang 23) ×IR 30	1,123	292	26.0
(TCS 3×TNG 67) × (BG 35-2×ACC)	1,213	154	12.7
(TC S3×TNG 67) ×IR 30	602	146	24.3
(BG 35-2×PI 162319) ×Milyang 23	2,400	33	1.4
M 9×IR 30^2	1,122	289	25.8
KSY 104×TNG 67	2,254	608	26.9
M 9×IR 30	641	218	34.0
M 9×CNY 247[a]	844	359	42.5
SD 7×CNY 243[a]	600	168	28.0
SD 7×IR 36	1,497	181	12.1
SD 7×Kabara	1,829	239	13.1
M 9× (Tan. 1×Ta-Poo-Cho-z)	1,114	360	32.3
Taichung 65[b] (CK-1)	1,065	396	37.2
Tainung 67[b] (CK-2)	1,856	835	45.0
Tainan 5[b] (CK-3)	662	219	33.1

a. *Japonica* x *Japonica*
b. *Japonica* type

癒傷組織移至分化培養基上，有些可分化成綠苗，白苗及根或不正常植物體，但有些並不分化，經繼續生長後逐漸轉為黃色、褐色，甚至黑褐色而死亡。表二顯示不同雜交組合花葯癒傷組織的綠苗分化率差異很大，頻度介於 0～3 % 之間，且白苗的分化率均大於綠苗分化率 ，花葯癒傷組織誘導率與花葯癒傷組織的分化率間，經統計分析不具相關性 (r=−0.248) 。本試驗綠苗分化所得百分比均偏低，且白苗，根及不正常芽體所佔百分比相當高，其原因不明，是雜交種花葯培養特有的現象，抑或其它環境因子造成，有待進一步研究。稉稻品種間花葯癒傷組織的綠苗分化率，隨品種之不同略有差異，惟較秈稉稻雜交組合者高，頻度介於 3.2～12.0 % 之間，其中以臺農 67 號的綠苗分化率最高，臺中 65 號次之，臺南 5 號最差。

表 2. 秈稉稻雜種花葯癒傷組織之綠苗、白苗分化率 (1979 年二期作)

Table 2. The formation of normal green and albino plants differentiated from anther callus of hybrid (*japonica* x *indica*) rices. (Second Crop, 1979)

Cross combinations	No. of callus cultured	Percent of callus forming plant		Percent of roots & abnormal shoots
		Green	Albino	
(M 9×Milyang23) ×IR 30	133	3.0	9.0	28.5
(TCS 3×TNG 67) × (BG 35-2×ACC)	101	1.0	14.9	27.8
(TCS 3×TNG 67) ×IR 30	64	0.0	12.5	9.4
(BG 35-2×PI 162319) ×Milyang 23	20	0.0	5.0	10.0
M 9×IR 30^2	121	0.9	10.7	19.0
KSY 104×TNG 67	432	0.7	13.0	9.1
M 9×IR 30	153	0.6	1.3	7.8
M 9×CNY 247[a]	237	0.8	3.8	4.7
SD 7×CNY 243[a]	84	0.0	3.6	21.4
SD 7×IR 36	180	1.1	6.6	4.9
SD 7×Kabara	231	2.2	9.5	14.3
M 9× (Tan. 1×Ta-Poo-Cho-z)	310	1.3	8.7	12.3
Taichung 63[b] (CK-1)	396	4.5	5.6	14.8
Tainung 67[b] (CK-2)	835	12.0	5.0	13.1
Tainan 5[b] (CK-3)	219	3.2	6.8	15.1

a. *Japonica* x *Japonica*
b. *Japonica* type

表 3. 稉稻、秈稻及秈稉稻雜種的花葯培養 (1980 年一期作)

Table 3. Anther callus developed from *japonica*, *indica* and hybrid (*japonica* x *indica*) rices. (First Crop, 1980)

Varieties and cross combinations	No. of anthers cultured	No. of anthers forming callus	Percent of anthers forming callus
Tainan 5	745	77	8.3
Tainung 67	699	70	10.0
IR 36	791	5	0.6
Chianung-Sen 11	394	0	0.0
Tainung 67×IR 36	3426	300	8.6
Tainung 67×Chianung-Sen 11	2802	187	6.7
Tainan 5×IR 36	3086	354	11.5
Tainan 5×Chianung-Sen 11	3536	148	4.2

表 3 的結果再度顯示秈稉稻雜種及栽培品種間的花葯培養，癒傷組織的誘導率差異極大，以臺南 5 號×IR 36 的組合 11.5 % 最高，嘉秈 11 號之誘導率爲 0 最低。在四個雜交組合中，表現出含嘉秈 11 號的雜交組合，其癒傷組織的形成率都較低，如臺農 67 號×嘉秈 11 號爲 6.7 % ，臺南 5 號×嘉秈 11 號僅 4.2 % ；另一方面含 IR 36 之組合都較高，各爲 8.6 及 11.5 % ，這種結果說明了雜交種的花葯培養，癒傷組織形成的難易，可能與親本誘導癒傷組織之難易有關。

表 4 顯示秈稉稻雜種花葯癒傷組織，分化所得成活的綠苗，多倍體及單倍體植株的數目分別佔 48.33 % 及 33.33 % 。較自然倍加之二倍體 18.33 % 高出甚多；而表 5 顯示稉稻花葯癒傷組織

表 4. 秈稉稻雜種花葯來源癒傷組織分化所得植物體染色體之分佈（1979 年二期作）

Table 4. The distribution of chromosome numbers in anther-derived plants of hybrid (*japonica* x *indica*) rices. (Second Crop, 1979)

Cross combinations	Number of plants			Total
	Haploid	Diploid	Polyploids	
(M 9×Milyang 23) ×IR 30	8	6	1	15
(TCS 3×TNG 67) × (BG 35-2×ACC)	4	1	6	11
(TCS 3×TNG 67) ×IR 30	0	0	5	5
(BG 35-2×PI 162319) ×Milyang 23	0	0	1	1
M 9×IR 30^2	4	2	4	10
KSY 104×TNG 67	0	1	0	1
M 9×IR 30	1	0	5	6
SD 7×IR 36	1	0	1	2
SD 7×Kabara	0	0	2	2
M 9× (Tan. 1×Ta-Poo-Cho-z)	2	1	4	7
Total	20	11	29	60
Percentage	33.33%	18.33%	48.33%	

表 5. 稉稻花葯來源癒傷組織分化所得植物體染色體之分佈（1979 年二期作）

Table 5. The distribution of chromosome numbers in anther-derived plants of *japonica* rices. (Second Crop, 1979)

Varieties	Number of plants			Total
	Haploid	Diploid	Polyploids	
Tainan 5	4	4	0	8
Taichung 65	6	19	4	29
Tainung 67	17	25	5	47
Total	27	48	9	84
Percentage	31.9 %	57.2 %	10.7 %	

分化成多倍體及單倍體植株的數目分別佔 10.7 及 31.9 %，卻又比自然倍加之二倍體（57.2 %）少得多，這種相反的結果是否因親本親緣關係之遠近，而影響到花葯癒傷組織形成植株之倍數體產生變異，有待進一步的研究。

表 3 所列雜種組合之花葯經培養後，依癒傷組織形成之早晚，分別移到分化培養基上，所得植物體分化之結果如表 6 所示，以花葯培養 30～37 天後所形成之癒傷組織，綠苗的分化率（7.7 %）最高，以後差異不大。培養 58～65 天後形成之癒傷組織，綠苗分化率雖高達 7.4 %（兩株），但因供試的癒傷組織數目太少，且形成的植株發育均屬不健全，移植後不能成活，故此項資料値得懷疑。一般言，花葯癒傷組織以早期形成者較具分化能力，以後隨著形成時期的延後，會增加不分化黃化癒傷組織的比例，因而影響了再分化的能力。

表 6. 秈稉稻雜種花葯癒傷組織形成的早晚與分化器官能力之關係

Table 6. Relationship between the timing of callus initiation and the ability of organ regeneration in cultured hybrid rice (Including 4 cross combinations list in table 5) anthers.

Days needed for cultured anthers producing callus	No. of callus cultured	Percent of callus producing green plant	Percent of callus producing albino plant	Percent of callus producing root	Percent of browning callus	Percent of yellowing callus
30-37	233	7.7	19.3	15.9	48.1	9.0
37-44	237	1.7	18.6	11.8	40.1	27.8
44-51	156	2.6	14.7	7.1	37.8	37.8
51-58	149	2.0	13.4	6.7	33.6	44.3
58-65	27	7.4[a]	18.5	7.4	29.6	37.0

a. abnormal plant, died after transplanting.

討　　論

許多報告指出水稻花葯培養癒傷組織的形成因品種、品系及雜交組合之不同而有很大的差異。Iyer 等培養 15 種秈稻花葯，只有 4 種可形成癒傷組織，其形成頻率在 2.94～5.51 % 之間[10]；陳和林等報導臺南 5 號及 H－124 兩種稉稻的花葯癒傷組織誘導率分別高達 15.3 及 44.7 %；而 Kabara 及嘉農秈 11 號等秈稻的誘導率僅 8.9 及 0.0 %[9]；蔡和林對 40 種水稻品種，品系及雜交 F_1 所做的花葯培養結果顯示，有 38 種可誘導癒傷組織，其中稉稻誘導率爲 0.50～20.21 %，秈稻爲 0～13.54 %[4]；林等研究影響水稻花葯起源癒傷組織形成諸因子中，發現稉稻較秈稻易於誘導癒傷組織[2]。這些試驗結果都顯示稉稻花葯癒傷組織的誘導較秈稻容易。本文表 4、5 所得的結果除顯示花葯癒傷組織的誘導，稉稻比秈稻容易外，還明顯的可看出品種誘導率的高低會影響到以它爲親本的雜交組合，如表 1，M 9×嘉農育 247 及 SD 7×嘉農育 243 兩稉×稉雜交組合，誘導率普遍高於其他稉×秈或秈×稉的雜交組合。含有 M 9 及 IR 30 之秈稉稻雜種，其花葯癒傷組織的誘導率一般又比其他秈稉雜交組合高；表 5 顯示含有無法誘導花葯癒傷組織形成之嘉農秈 11 品種之雜交組合，其癒傷組織誘導率都偏低，這種結果使我們相信水稻花葯培養癒傷組織之誘導與品種有關。

花葯癒傷組織再分化的能力，據蔡和林等報導，因品種或雜交組合不同，再分化成白苗或綠苗的比率頗不一致，稉稻分化成綠苗的比率高於白苗，而秈稻或雜交種花葯癒傷組織的分化情形爲白苗高出綠苗甚多[4]，本研究表 2 及表 4 所得的結果，亦顯示了上述相同的結果。吳等從事栽培稻（臺中 65 號）×野生稻（*Oryza perennis* Moench）雜種花葯的培養，發現誘得的癒傷組織只能分化成白

苗，無法分化成綠苗，若回交栽培稻，則癒傷組織可分化少許正常的綠苗，但白苗數仍高出綠苗甚多。以栽培稻爲第一雜交母本時，其癒傷組織及正常綠苗的數目比野生稻爲第一雜交母本時高。這些結果顯示水稻花葯培養，癒傷組織及白苗、綠苗分化的機制，可能與細胞質遺傳有關[1][13]。另一方面Chen[7] 在三種不同蔗糖濃度下誘導臺南5號水稻花葯癒傷組織形成時，發現雖然高濃度的蔗糖（6～9%）有助於癒傷組織誘導率的提高，但過高濃度的蔗糖（9%）會使誘得之癒傷組織分化較多之白苗，這種情形又顯示白苗產生的機制也可能受生理，環境的影響，其眞正的原因，實有待進一步的研究。

表4、5的資料顯示秈稉雜種花葯癒傷組織分化之正常綠苗，其單倍體、多倍體與自然倍加二倍體的比例與一般稉稻品種癒傷組織分化所得綠苗之倍數體情況完全相反。這些自然倍加的二倍體經由田間後裔鑑定結果沒有分離的現象（本文發表中）證明了這些二倍體是由單倍體自然倍加而來。許多報告也都曾以標示因子的方法鑑定出水稻花葯培養獲得的二倍體植物是經由單倍體自然倍加而來[3,11]，本文資料顯示稉稻的花葯癒傷組織自然倍加後，再經由核融合或 endomitosis 的過程形成多倍體的機會不多，而秈稉稻雜種則自然倍加成二倍體後又會繼續發生許多核融合及 endomitosis，進而變成多倍體，這種核融合及 endomitosis 的機制也是頗爲耐人尋味的問題。

蔡和林等報導癒傷組織日齡不同會影響花葯癒傷組織再分化的能力，10 日左右（肉眼可見之日起十天，其直徑約 0.2～0.4 cm）之癒傷組織分化成植株的百分比最高，且綠苗數最多，太老或經由繼代培養者不但分化能力降低，且將使白苗比例增高[4]。本試驗結果顯示癒傷組織形成的早晚，會影響其再分化的能力，愈早形成之花葯癒傷組織，其分化能力愈强，反之，後期形成之癒傷組織，分化能力變差。賴等[6]報導愈早褐化的花葯，將愈晚或幾乎不形成花葯癒傷組織，同時大多數有效之花葯癒傷組織都形成於培養早期，這種結果說明了培養花葯早期形成癒傷組織的重要性。

利用培養秈稉稻雜種花葯的方法，使秈稉稻間產生遺傳質的互換及迅速固定的育種方式，本文的資料顯示，是可行的，但實際育種工作的進行，仍有賴提高單倍體及自然倍加二倍體綠苗的產生來配合。有了大量的固定後裔，才能提高選拔優良個體的機會。故如何減低白苗的產生，增大綠苗形成的機會，是我們今後從事秈稉稻花葯培養育種所應努力的目標。

引 用 文 獻

1. 吳旭初、莫道・1978・稻屬種間雜種之花葯培養・中央研究院植物研究所 科學論文 第214號。
2. 林正義、曾美倉、蔡新聲・ 1974 ・影響水稻花葯起源癒傷組織形成諸因子之研究。國立臺灣大學農學院研究報告 15(2)：1-16。
3. 許淑卿、陳其昌・1977・水稻花葯培養之研究：二元體花葯植株的來源・科學發展月刊 5(10)：834-839。
4. 蔡秀錦、林明華・1977・水稻花葯培養以育成植株之研究・中華農業研究 26(2)：100-112。
5. 蔡新聲・ 1980 ・花葯培養單倍體植物之形成及應用・科學農業 28(11-12)：379-396。
6. 賴本智、蔡新聲、紀迺淳・1980・水稻培養花葯褐變與癒傷組織形成之關係・中華農業研究 29(2)：137-146。
7. Chen, C. C. 1978. Effects of sucrose concentration on plant production in anther culture of rice. Crop Science 18：905-906.
8. Chen, C. C. and C. M. Chen. 1979. A method for anther culture of rice. TCA Manual 5(2)：1051-1053.
9. Chen. C. C. and M. H. Lin. 1976. Induction of rice plantlets from anther culture. Bot. Bull. Academia Sinica 17：18-24.
10. Iyer, R. D. and S. K. Rainz. 1972. The early ontogeny of embryoids and callus subsequent organogenesis in anther cultures of *Datura metel* and rice. Planta 104：146-156.
11. Mok, T. and S. C. Woo. 1976. Identification of pollen plants regenerated from anthers of an inter-subspecific rice hybrid. Bot. Bull. Academia Sinica 17：169-174.

12. Murashige, T. and F. Skoog. 1962. A revised medium for rapid growth and bio-assays with tobacco tissue culture. Physiol. Plant. 15 : 473-487.

13. Woo, S. C., T. Mok and J. Y. Huang. 1978. Anther culture of *Oryza sativa* L. and *Oryza perennis* Moench hybrids. Bot. Bull. Academia Sinica 19 : 171-178.

14. Woo, S. C. and H. Y. Su. 1975. Doubled haploid rice from Indica and Japonica hybrids through anther culture. Bot. Bull. Academia Sinica 16 : 19-24.

15. Woo, S. C. and I. J. Tung. 1972. Induction of rice plants from hybrid anthers of indica and japonica cross. Bot. Bull. Academia Sinica 13 : 67-69.

The culture of rice anthers of *japonica* x *indica* crosses[1]

H. S. Tsay, Y. C. Teng, P. C. Lai and N. C. Chi[2]

Summary

Sterility and continuous segregation are the two main problems in the cross breeding between *japonica* and *indica* rices. The complete homozygous diploid plants obtained by anther culture provide the opportunity to overcome these difficulties.

By culturing anthers derived from *japonica* x *indica* crosses, it was found that despite the easy induction of callus, further differentiation of green plantlets from such callus was extremely difficult that a high percentage of albino plants was observed. Much more haploid and polyploid than naturally occurred double-haploid plants were obtained from anther callus of *japonica* x *indica* (F_1) rices. On the contrary, anther callus from *japonica* rice varieties tended to produce more natural double-haploid plants.

The timing of callus occurrence was found to be related to the ability of organ regeneration. Callus induced at early stage of culture, e. g., 30-40 days after anthers were inoculated, possessed high ability of differentiation. Those induced at the later stage, e. g., 60-70 days in culture, might completely lose their differentiation ability.

1. Contribution No. 980 from the Taiwan Agricultural Research Institute.

2. Senior Agronomists and Research Assistants, respectively of the Department of Agronomy, TARI. Wufeng, Taichung Hsien, Taiwan 431, ROC.